

CARACTÉRISTIQUES DE LA GERMINATION DES ASCOSPORES DE *TERFEZIA ARENARIA* (MORIS) TRAPPE, RÉCOLTÉ EN ALGÉRIE

Z. FORTAS * et G. CHEVALIER **

* Institut des Sciences de la Nature, Université d'Oran-es-Senia, Algérie.

** I.N.R.A., Station d'Agronomie et de Mycologie, 12 av. du Brézet, 63039 Clermont-Ferrand Cedex, France.

RÉSUMÉ - La germination des ascospores de *Terfezia arenaria* provenant d'ascocarps secs a été obtenue sur quatre milieux de culture différents. Elle est caractérisée par une phase de latence d'origine inconnue et de durée variable, par un taux de germination faible et variable également, selon le milieu de culture. Elle est précédée par le gonflement de l'ascospore, qui double presque de volume. La forme de l'ascospore n'est pas modifiée. Différentes hypothèses sur les mécanismes à l'origine de la dormance des ascospores sont émises.

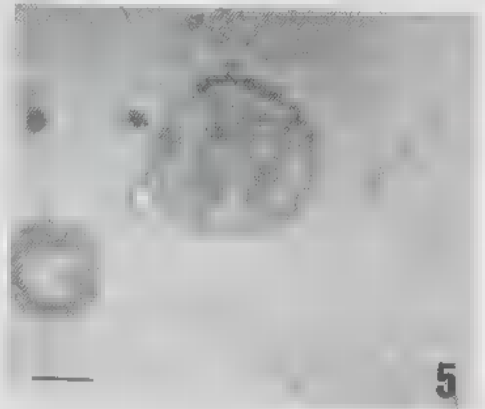
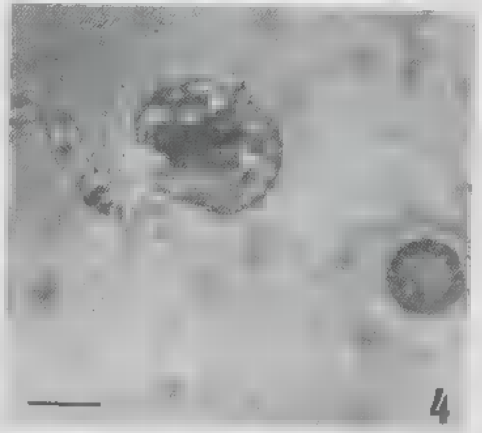
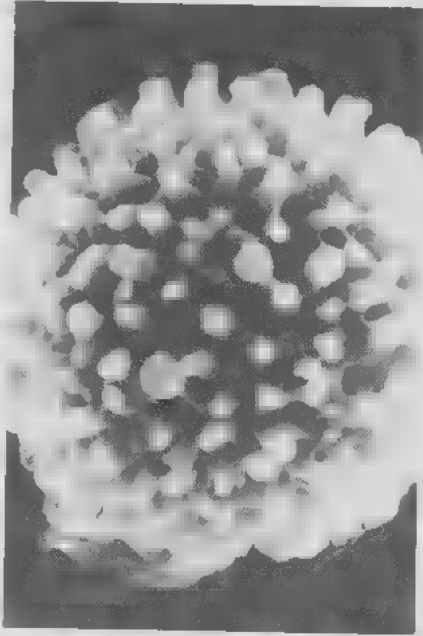
ABSTRACT - The germination of *Terfezia arenaria* ascospores originating from dried ascocarps was obtained on four different culture media. It was characterized by a latency period of unknown origin and variable duration and preceded by swelling of the ascospores resulting in a doubling of their volume. The ascospore shape was not modified. Various hypotheses about the mechanisms which might cause ascospore dormancy are suggested.

MOTS CLÉS : germination, ascospores, dormance, *Terfezia arenaria*.

INTRODUCTION

De nombreux champignons mycorhiziens sont facilement isolés et cultivés sur milieux artificiels; par contre, les cultures de mycélium des champignons des genres *Tuber*, *Terfezia* et *Tirmania* sont plus difficiles à obtenir. On ne connaît aucun milieu véritablement favorable à la germination des ascospores de *Tuber*.

Les méthodes d'isolement et de culture des *Tuber* ont fait l'objet de nombreuses recherches. Des travaux sur la germination des ascospores de *Tuber melanosporum* ont été effectués par Melendez-Howell & Cailleux (1971), Grente & al. (1972), Rouquerol & Payré (1975a). Les différentes méthodes d'isolement du mycélium et l'obtention des cultures mycéliennes de *Tuber melanosporum* ont été rapportées par Fontana (1968, 1971), Chevalier (1972), Rouquerol & Payré (1975b). En ce qui concerne les Terfez, la germination des ascospores de quatre espèces de Terfez (*Terfezia boudieri*, *T. claveryi*, *Tirmania pinoyi* et *T. nivca*) a été obtenue pour la première fois, au Koweït, par Awameh & Alsheikh (1979a et b, 1980a et b). Les cultures obtenues à partir de ces ascospores se sont révélées mycorrhizogènes (Awameh et al., 1979).



L'objet de cette étude est de présenter les premiers résultats sur les caractéristiques de la germination des ascospores de *Terfezia arenaria* (Moris) Trappe (= *Terfezia leonis* Tul.).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les corps fructifères de *T. arenaria* ont été récoltés en avril 1986 dans les zones semi-arides d'Algérie (Zeriguët), à proximité de la plante-hôte, *Helianthemum guttatum*.

T. arenaria se différencie des autres espèces de Terfez par l'ornementation des ascospores qui sont sphériques, à verrues tronquées en "dents d'engrenage" (Fig. 1); elles mesurent $20.1 \pm 0.2 \mu\text{m}$ de diamètre (Tab. 2)

Dans le cas des Terfez, il n'a jamais été possible d'isoler le champignon à partir de fragments de glebe (Fortas, 1990), comme chez les truffes (Fontana, 1968, 1971; Chevalier, 1972); l'isolement à partir de mycorhizes a été réussi par Awamch & Alsheikh (non publié), suivant la technique utilisée par Chevalier avec *Tuber melanosporum* (1972), mais il est délicat; les cultures mycéliennes ont donc été isolées à partir d'ascospores extraites d'ascocarpes desséchés au soleil, pendant deux mois, puis conservés à la température ambiante.

La méthode consiste à prélever des fragments de glebe à partir d'exsiccata d'ascocarpes dont la surface a été préalablement désinfectée à l'alcool; les fragments sont réhydratés dans de l'eau stérile, puis broyés à l'aide d'un homogénéiseur à très faible vitesse, toujours dans de l'eau stérile, de manière à obtenir une suspension d'ascospores. Une goutte de cette suspension sporale est étalée à la surface d'une boîte de Petri, sur milieu nutritif gélosé.

Figure 1: Ascospore de *T. arenaria* observée au microscope électronique à balayage; les verrues sont cylindriques et tronquées au sommet. Echelle: $5 \mu\text{m}$.

Figure 1: *Terfezia arenaria* ascospores observed by scanning electron microscopy. The spore warts are cylindrical and their tops are truncated. Scale: $5 \mu\text{m}$.

Figure 2: Gonflement d'une ascospore en cours de germination; remarquer la présence du globule réfringent à l'intérieur de la spore. Echelle: $10 \mu\text{m}$.

Figure 2: Ascospore swelling during the germination. A refringent corpuscle can be observed inside the spore. Scale: $10 \mu\text{m}$.

Figure 3: Détail de l'exospore rompue, avant l'extrusion du tube germinatif. Echelle: $10 \mu\text{m}$.

Figure 3: Detail of the broken exospore before the germ-tube shoots out. Scale: $10 \mu\text{m}$.

Figure 4: Tube germinatif unique émis par l'ascospore; remarquer le diamètre de la spore en germination par rapport à celui de la spore non germée. Echelle: $20 \mu\text{m}$.

Figure 4: Ascospore with single germ-tube. The diameter of this germinating spore appears larger than that of the non-germinating one. Scale: $20 \mu\text{m}$.

Figure 5: Deux tubes germinatifs émis par une ascospore; remarquer la libération des globules lipidiques et le diamètre de la spore en germination comparativement à celui de la spore non germée. Echelle: $10 \mu\text{m}$.

Figure 5: Ascospore producing two germ-tubes. The lipid corpuscles are released and the diameter is larger in the germinating spore in comparison with the non-germinating one. Scale: $10 \mu\text{m}$.

Quatre milieux nutritifs ont été testés:

- le milieu K.I.S.R., mis au point par le Kuwait Institute for Scientific Research; il est préconisé par Awameh & Alsheikh (1979a et b, 1980a et b) comme milieu d'isolement, de conservation et de multiplication pour différentes espèces de *Terfez*; sa composition chimique fait l'objet d'une protection,

- le milieu MmA (Hewitt, 1966), utilisé par Michaels (1982) pour étudier la croissance de diverses espèces de truffes et repris par Ravolanirina (1986) pour la culture de cinq espèces de *Terfez* (quatre espèces du Koweit et une espèce française),

- le milieu de la Station d'Agronomie de l'I.N.R.A. de Clermont-Ferrand (Morizet & Mingeau, 1976; Chevalier & Desmas, 1977a) modifié par addition de malt à 1%,

- le milieu Ma constitué de malt (Cristomalt) à 1%.

Ces deux derniers milieux sont couramment utilisés à l'I.N.R.A. de Clermont-Fd.

Les boîtes de Petri ont été incubées à 25°C et observées chaque jour. La germination a été suivie *in vitro*, au microscope optique, et un comptage a été effectué sur 300 ascospores jusqu'à ce que la germination ait cessé. Le taux de germination a été exprimé par le pourcentage d'ascospores germées par rapport au nombre total d'ascospores. Les mesures du diamètre des ascospores et de la section des hyphes de germination ont été analysées statistiquement par le test "t" de Student. Les valeurs ont été indiquées avec leur intervalle de confiance, pour un coefficient de sécurité de 95% .

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La germination des ascospores a été possible sur les quatre milieux nutritifs testés (Tab. 1). Quel que soit le milieu, les ascospores possèdent une phase de latence, dont la durée varie de 5 à 12 jours; le taux de germination est toujours faible; il varie toutefois selon le milieu de culture (Tab. 1).

La libération de petits globules lipidiques par l'ascospore, avant sa germination, peut constituer un indice de sa capacité à germer. En période de germination, les ascospores renferment un ou deux globules très réfringents et augmentent de volume (Fig. 2), leur diamètre doublant approximativement (Tab. 2); l'exospore est ensuite rompue (Fig. 3) et on observe l'extrusion du tube germinatif. Les tubes germinatifs sont le plus souvent uniques (Fig. 4); on en observe rarement deux (Fig. 5). L'hyphé qui émerge du corps sporal s'allonge puis se ramifie. Les ascospores peuvent gonfler (Fig. 6) et germer même à l'intérieur de l'asque; le tube germinatif traverse alors directement la paroi de l'asque (Fig. 7).

Dans certains lots d'ascospores nous avons souvent observé la présence de quelques ascospores de couleur et diamètre différent de l'ensemble (Fig. 8 et 9). Ces ascospores de grande dimension mesurent 30,8 à 51,3µm de diamètre; leur couleur est plus foncée et leur ornementation plus dense; elles sont au nombre de un à trois par asque (Fig. 8 et 9). Ces ascospores n'ont jamais germé, quelle que soit la durée d'incubation. Ce type d'ascospores a également été observé dans des exemplaires de *T. claveryi* récoltés en Algérie.

Milieu Espèces	K.I.S.R.	HEWITT	MALT	MORIZET
<i>T. arenaria</i>	11 j. 21,1%	5 j. 14,5%	5 j. 12,5%	12 j. 17,8%
<i>T. claveryi</i>	16 j. 14,2%	7 j. 37,3%	10 j. 15,6%	7 j. 39,2%
<i>T. pinoyi</i>	15 j. 12,7%	14 j. 16,7%	15 j. 25%	15 j. 26,8%

Tableau 1: Durée moyenne de la phase de latence (en jours) et pourcentage de germination des ascospores des espèces de Terfez étudiées.

Table 1: Average length of the latency period (in days) and ascospore germination percentage for the desert truffles species studied.

Espèces	Diamètre des ascospores (en μ)	
	avant germination	en début de germination
<i>T. arenaria</i>	20,1 \pm 0,2	37,6 \pm 6,1
<i>T. claveryi</i>	23,4 \pm 0,4	39,3 \pm 0,9
<i>T. pinoyi</i>	17,3 \pm 0,2	33,3 \pm 6,2

Tableau 2: Diamètre des ascospores (en μm) avant et en début de germination.

Table 2: Ascospore diameter (in μm) before and at the beginning of the germination.

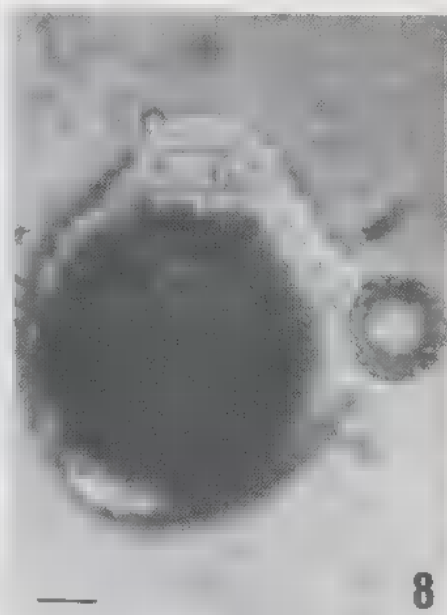
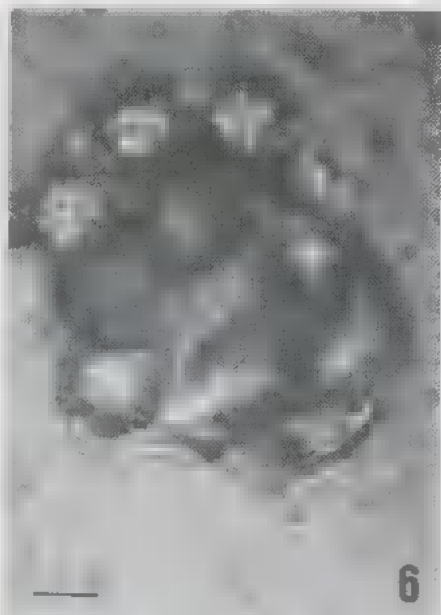
A la suite de ces observations, il a été possible de définir quelques caractéristiques importantes qui sont en accord avec celles faites par les chercheurs du K.I.S.R. sur d'autres espèces.

La germination est caractérisée par une phase de latence d'origine inconnue. Le pourcentage de germination des ascospores varie, dans une même espèce, selon les ascocarpes utilisés et le milieu de culture, d'où la difficulté de préconiser un milieu d'isolement standard pour les Terfez.

Au cours de la germination des ascospores de *T. arenaria*, le tube germinatif émerge d'un point quelconque de l'ascospore comme l'ont déjà signalé Awameh & Alsheikh (1979a et b, 1980a et b) chez les quatre espèces de Terfez du Koweït. Nous n'avons pas observé non plus de site spécifique de sortie du tube germinatif, ni l'existence d'un pore germinatif, contrairement à ce qu'ont signalé divers auteurs dans le cas des ascospores de *Tuber* (Melendez-Howell & Cailleux, 1971; Grente et al., 1972; Rouquerol & Payré, 1975b). La germination des ascospores à l'intérieur de l'asque et le passage du tube germinatif à travers la paroi ascale ont également été observés *in vitro* par Dupré & Chevalier (non publié) chez *Tuber melanosporum*, mais dans ce cas, il n'y a pas gonflement préalable de l'ascospore.

La présence d'ascospores de grande dimension chez *T. arenaria*, comme chez *T. claveryi*, est difficile à expliquer. Existe-t-il deux types d'ascospores chez ces espèces? Ces ascospores ont-elles des propriétés spéciales? Aucun résultat ne nous a permis de le confirmer étant donné la rareté de ces ascospores et leur inaptitude à germer.

Des études réalisées sur la germination des ascospores de deux autres espèces de Terfez d'Algérie, *Terfezia claveryi* et *Tirmania pinoyi* n'ont pas da-



vantage permis de connaître l'origine du faible pouvoir germinatif des ascospores de ces champignons (Tab. 1 et 2). Dans le cas de *T. melanosporum*, de nombreux facteurs susceptibles d'agir sur la germination des ascospores ont été évoqués (âge des ascospores, humidité relative, imperméabilité des enveloppes sporales) et de nombreux traitements destinés à lever la dormance des ascospores ont été tentés (chocs thermiques, attaques enzymatiques, traitements chimiques, etc...) (Grente et al., 1972; Kulifaj, 1984). Il est certain que la dessiccation du corps fructifère exerce un effet positif sur la germination des ascospores, comme dans le cas des Terfez; il en est de même de l'action des basses températures (Chevalier, non publié). L'âge des spores est également important, les spores à épispore translucide germant plus facilement que celles à épispore sombre (Chevalier & Desmas, 1977b); enfin, certains traitements chimiques peuvent provoquer l'activation des spores: à l'I.N.R.A. de Clermont-Ferrand, Dupré a obtenu la germination de spores de *T. melanosporum* à l'intérieur des asques en les traitant à l'eau oxygénée, mais elle n'a pu renouveler l'expérience.

Comme les ascospores des *Tuber*, celles des Terfez présentent donc un phénomène de dormance, mais il est moins prononcé. Il peut s'agir d'une dormance constitutive (par exemple, barrière mécanique due à l'épaisseur de la paroi sporale constituant un obstacle à la pénétration d'éléments nutritifs) et ou exogène (absence de certains facteurs de croissance dans le milieu de culture); les deux phénomènes peuvent coexister. Le faible taux de germination des ascospores de Terfez montre que les facteurs qui peuvent lever la dormance ne sont pas bien maîtrisés.

CONCLUSION

L'étude montre que la germination des ascospores de *T. arenaria* peut être réalisée *in vitro* sur différents milieux de culture; elle est difficile, mais n'exige toutefois pas de traitements spécifiques (mécanique, thermique, chimique), contrairement à celle des ascospores de *Tuber melanosporum*, en conditions de milieu identiques. Il est probable que la dormance accentuée des ascospores est un facteur important de survie dans les conditions difficiles du désert, en été (sécheresse, température élevée); toutefois, la déshydratation des ascocarpes et

Figure 6: Gonflement des ascospores à l'intérieur de l'asque, au cours de la germination. Echelle: 10µm.

Figure 6: Ascospore swelling inside the ascus during the germination. Scale: 10µm.

Figure 7: Emission d'un tube germinatif par une ascospore contenue dans un asque. Echelle: 10µm.

Figure 7: Production of a germ-tube by an ascospore inside the ascus. Scale 10µm.

Figure 8: Asque contenant une seule ascospore de grande dimension; remarquer son diamètre par rapport à celui de la spore normale. Echelle: 10µm.

Figure 8: Ascus containing a single large ascospore. Its diameter is larger than that of a normal spore. Scale: 10µm.

Figure 9: Asque contenant trois ascospores de grande dimension; remarquer la densité de leur ornementation. Echelle: 10µm.

Figure 9: Ascus containing three large ascospores. The density of their ornamentation is notable. Scale: 10µm.

l'abrasion de la paroi des ascospores par le sable transporté par le vent doivent être des facteurs particulièrement favorables à la levée de dormance des ascospores de *Terfezia* qui se trouvent ainsi prêtes à germer à l'arrivée des premières pluies d'automne.

BIBLIOGRAPHIE

- AWAMEH M.S. and ALSHEIKH A., 1979a - Laboratory and field study of four kinds of truffle (Kamah), *Terfezia* and *Tirmania* species, for cultivation. *Mushroom. Sci.* 10: 507-517.
- AWAMEH M.S. and ALSHEIKH A., 1979b - Characteristics and ascospore germination of white kamé (*Tirmania nivea* and *T. pinoyi*). *Ann. Phytopathol.* 11: 223-229.
- AWAMEH M.S., ALSHEIKH A. and GHAWAS S., 1979 - Mycorrhizal synthesis between *Helianthemum ledifolium*, *H. salicifolium* and four species of the genera *Terfezia* and *Tirmania* using ascospores and mycelial cultures obtained from ascospore germination. Proc. 4th. North Americ. Conf. on Mycorrhizae, Fort Collins, Colorado, U.S.A.
- AWAMEH M.S. and ALSHEIKH A., 1980a - Ascospore germination of black kamé (*Terfezia boudieri*). *Mycologia* 72: 50-54.
- AWAMEH M.S. and ALSHEIKH A., 1980b - Features and analysis of spore germination in brown kamé *Terfezia claveryi*. *Mycologia* 72: 494-499.
- CHEVALIER G., 1972 - Obtention de cultures pures de mycélium de truffe à partir du carpophore et des mycorhizes. *Compt. Rend. Séances Acad. Agric. France* 58: 981-989.
- CHEVALIER G. et DESMAS C., 1977a - Mycorrhization par *Tuber melanosporum* de plants de *Quercus pubescens* en milieu fortement fertilisé. *Ann. Phytopathol.* 9: 93.
- CHEVALIER G. et DESMAS C., 1977 b - Synthèse des mycorhizes de *Tuber melanosporum* avec *Corylus avellana* sur gélose à partir de spores. *Ann. Phytopathol.* 9: 531.
- FONTANA A., 1968 - Miceli di fungi ipogei in coltura pura. Atti I Congr. Intern. sul Tartufo, Spoleto, 9 p.
- FONTANA A., 1971 - Il micelio di *Tuber melanosporum* in coltura pura. *Allionia* 17: 19-23.
- FORTAS Z., 1990 - Etude de trois espèces de Terfez: caractères culturaux et cytologie du mycélium isolé et associé à *Helianthemum guttatum*. Thèse Doct. Univ. Oran, 166 p.
- GRENTE J., CHEVALIER G. et POLLACSEK A., 1972 - La germination de l'ascospore de *Tuber melanosporum* et la synthèse sporale des mycorhizes. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, série D, 275: 743-746.
- HEWITT E.J., 1966 - Sand and water culture methods in the study of plant nutrition. In: Techn. Comm. n° 22 (2nd ed., revised). London, Commonwealth Agricultural Bureau, 547 p.
- KULIFAJ M., 1984 - *Tuber melanosporum* Vitt.: Contribution à l'étude de la morphogénèse et de la physiologie de l'ascocarpe. Thèse Doct. 3ème cycle, Univ. P. Sabatier, Toulouse, 72 p.
- MELENDEZ-HOWELL L.M. et CAILLEUX R., 1971 - Présence d'un pore germinatif sporale chez quelques espèces du genre *Tuber* Mich. ex Fr. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, série D, 273: 2485-2488.

- MICHAELS T.J., 1982 - *In vitro* culture and growth modeling of *Tuber spp.* and inoculation of hardwoods with *Tuber melanosporum* ascospores. Ph. D. Thesis, Oregon St. Univ., 120 p.
- MORIZET J. et MINGEAU M., 1976 - Influence des facteurs du milieu sur l'absorption hydrique. Etude effectuée sur la tomate décapitée en exsudation. *Ann. Agron. (Paris)* 27: 183-205.
- RAVOLANIRINA F., 1986 - Etude de l'influence de quelques facteurs sur la croissance mycélienne des Terfez *in vitro* et synthèse des mycorhizes. D.E.A. Biol. Physiol. Vég., Univ. Clermont-Ferrand II, 70 p.
- ROUQUEROL T. et PAYRE H., 1975a - Observation sur le comportement de *Tuber melanosporum* dans un site naturel. *Rev. Mycol.(Paris)* 39: 107-117.
- ROUQUEROL T. et PAYRE H., 1975b - Conséquences de quelques particularités des *Tuber* sur les caractères des cultures de mycélium et sur la formation des truffes. *Rev. Mycol.(Paris)* 39: 213-222.